



TITLE:

マイクロチップ電気泳動における オンライン試料濃縮技術

AUTHOR(S):

北川, 文彦; 末吉, 健志; 大塚, 浩二

CITATION:

北川, 文彦 ...[et al]. マイクロチップ電気泳動におけるオンライン試料濃縮技術. ぶんせき 2011, 435: 143-149

ISSUE DATE:

2011-03-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/194028>

RIGHT:

© 日本分析化学会

進歩総説

マイクロチップ電気泳動における オンライン試料濃縮技術

北川 文彦, 末吉 健志, 大塚 浩二

1 はじめに

数 cm 角のガラスやポリマー基板上に微細な溝（マイクロチャンネル）を作製し、そのチャンネル中でキャピラリー電気泳動（CE）の分離原理に基づく分析を行うマイクロチップ電気泳動（MCE）は、1990 年代初頭に Manz らによって最初に報告¹⁾²⁾されて以来、急速な進歩を遂げている。MCE は、従来の CE が有する特長（超微量分析・高分離能）に加え、分析の高速化やチャンネルの並列化によるハイスループット化³⁾⁴⁾が可能になるなどの利点を兼ね備えているため、マイクロチップ分析における最も重要な分離技術の一つとなったが、濃敏感度が低いことがしばしば問題となっている。この検出感度の問題を解決するため、マイクロチャンネル内で試料成分を濃縮してから分離を行うオンライン試料濃縮技術の開発が進展している。オンライン試料濃縮法は、前処理操作による濃縮に比べて、短時間かつ簡便に検出感度を向上できる点で優れており、種々の分離モードおよび対象試料に適した手法が CE において開発されてきた。このようなオンライン試料濃縮法を MCE に適用する例も多いが、マイクロチップの特徴を利用した新たな濃縮法の開発や、微細加工技術を駆使して濃縮サイトを作製する試みなども報告されている。本稿においては MCE におけるオンライン試料濃縮法の開発について、2008 年以降の文献を中心に紹介する。なお、それ以前の濃縮技術の進展については、拙著を参考にいただきたい⁵⁾。

2 異種組成の二液間における速度変化を利用するオンライン試料濃縮法

CE においては、試料成分の移動速度が溶液組成によって大きく変化することを利用した濃縮法が開発されてきた。すなわち、電気伝導度、添加剤、pH などが泳動液と異なる試料溶液を調製して分離チャンネルに注入すると、二液間での速度変化により試料成分がその境界面付近に濃縮される。MCE においてもこの方法は有効で

あり、濃縮用のチャンネルと分離チャンネルを接続することで検出下限を向上させる試みなども報告されている。さらに、MCE においては濃縮・分離過程のイメージングが容易であることを利用し、新規なオンライン試料濃縮法の開発や濃縮機構の解明も行われている。

2.1 電場増強スタッキング

電場増強スタッキング法（field-amplified sample stacking ; FASS）は、試料溶液と泳動液の電気伝導度の違いを利用してイオン性試料の泳動速度に差をつける手法で、オンライン試料濃縮法の中でも最も基本的な手法である⁶⁾。FASS では、泳動液を希釈した溶液、すなわち電気伝導度を低くした溶液に試料成分を溶解し、試料溶液をゲート注入法⁷⁾により長いプラグとして分離チャンネル内に注入する。チャンネルに電圧を印加すると、電気伝導度の低い試料ゾーンの電場強度はより高くなり、泳動液ゾーンの電場強度は相対的に低くなる。したがって、試料ゾーンにおける成分の泳動速度は泳動液ゾーンにおける速度よりも速くなる。その結果、速く泳動する試料成分は、泳動液ゾーンに到達した途端に速度が遅くなるために、二つのゾーンの境界面付近に濃縮され、細いゾーンとなる。CE においては 100 倍程度の濃縮率が得られるため、イオン種の分析に利用されている。

MCE においても FASS はよく用いられており、アミノ酸、タンパク質、アミン類、金属イオン、DNA などの分析に適用されてきた。これまでの例では、ほとんどが蛍光法により検出されていたが、最近では電気化学検出や電気伝導度検出法と FASS を組み合わせた MCE が行われており、食品中の色素⁸⁾、無機アニオン⁹⁾、アミン類¹⁰⁾、抗生物質¹¹⁾などの分析に適用されている。また、さらなる高感度化を実現するために、FASS 用のチャンネルと分離チャンネルを結合したデバイス¹¹⁾や、長いオフセット部を設けたダブル T 型のチャンネルチップ¹²⁾を適用する例も報告されている。後者のチップデバイスでは、オフセット部に充填した試料を FASS により濃縮した後、分離チャンネルに注入することで高感度化を図っており、Y 染色体由来短鎖縦列反復配列（Y-STR）の遺伝子型解析をわずか 25 pg の DNA から行う

On-line Sample Preconcentration Techniques in Microchip Electrophoresis.

ことに成功している。Kawai らは、large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP)¹³⁾ と呼ばれるスタッキング法を改良し、電気的試料注入操作の不要な MCE 分析法を開発している¹⁴⁾。この改良 LVSEP 法では、電気浸透流 (electroosmotic flow; EOF) を抑制する修飾を施した直線状チャネル全体に電気伝導度の低い試料溶液を注入し、一定電圧を印加するだけで濃縮・分離が進行する。チャネル全体に注入したアニオン性試料が濃縮されてから陰極近傍まで移動した後、泳動する向きが反転して分離が行われるため、高感度化と高分離能を両立できることが示されている。この LVSEP 法はアニオン性色素で染色したオリゴ糖の MCE 分析に適用され、分離能を損なうことなく 2900 倍の高感度化を実現している。糖のみならず、種々の生体試料にも適用可能なオンライン試料濃縮法であるため、今後の進展が注目される。

2・2 等速電気泳動

等速電気泳動 (isotachopheresis; ITP) はイオン性試料をその電気泳動移動度よりも速い電解質イオン (リーディングイオン; L) を含む電解液と遅い電解質イオン (ターミナルイオン; T) を含む電解液との間に注入して電気泳動を行うと、試料成分が電気泳動移動度の順に分離されるモードであるが、試料イオンの濃度が L の濃度よりも低ければ、Kouhlausch 式を満たすように試料は濃縮される。この ITP により濃縮した成分をほかのモードに移行させて分離する手法は過渡的等速電気泳動 (transient-ITP; t-ITP) と呼ばれ、ゾーン電気泳動 (zone electrophoresis; ZE) やゲル電気泳動 (gel electrophoresis; GE) と組み合わせることにより様々なイオン種の分析が行われている。

CE において様々な形式の t-ITP が開発されているが、MCE では試料注入に制限があり、分析中の電解液の交換も難しいため、一般的なクロス型チャネルチップや T 型チャネルチップにおいては、L または T を含む試料溶液を用いて t-ITP が行われており、DNA^{15)~19)}、RNA²⁰⁾、タンパク質²¹⁾、オリゴ糖²²⁾などの濃縮・分離が報告されている。例えば Schoch らは、熱応答性ゲルを充填したチップにおいて t-ITP-GE 分析を行うことで、マイクロ RNA の精製・濃縮・定量に成功し、50000 倍もの感度向上を達成している²⁰⁾。一方、複数の T 型チャネルを有するチップを用いれば、試料溶液の前後に L 電解液および T 電解液を注入して ITP または t-ITP を行うことも可能であり、腫瘍マーカーである α -フェトプロテイン²³⁾、DNA ラダー²⁴⁾²⁵⁾、PCR 産物²⁴⁾の分析への適用が図られている。

Santiago らのグループは、ITP の特性を利用した非蛍光性試料の間接検出法を提案している²⁶⁾²⁷⁾。彼らは目的成分と移動度の異なる数種類の蛍光色素を試料溶液

に添加して ITP 分析を行うと、分離された目的成分が濃縮された蛍光色素ゾーンに挟まれて泳動することを利用し、蛍光バンド間の距離から非蛍光性成分の定量できることを示している²⁶⁾。さらに、目的成分と反対電荷を有する蛍光色素を添加した L 電解液を用いることにより、色素の濃度分布が電場強度に依存することを利用して ITP における分離ゾーンの可視化にも成功している²⁷⁾。一方、核酸とタンパク質などの移動度が大きく異なることを利用し、白血球可溶化液からの核酸の抽出・濃縮・精製を t-ITP により実現できることが報告されており、PCR の前処理へ応用できることが報告されている²⁸⁾。

また、t-ITP における濃縮率の向上を目指し、圧力注入や電気的注入による大量試料注入と組み合わせた手法の開発が進展している。Davis らは、LE を含む試料溶液を圧力により注入しながら ITP による濃縮を行った後、電解液を入れ替えて t-ITP-ZE 分析を行う手法を開発し、アミノ酸の検出下限を 200 fM まで向上することに成功している²⁹⁾。また、Hirokawa らは、FASS を伴う電気的試料注入と t-ITP を融合した動電過給法 (electrokinetic supercharging; EKS) を改良し、floating EKS と呼ばれる濃縮法を開発している³⁰⁾³¹⁾。この手法は、クロス型チャネルチップにおいて、長チャネルに試料イオンを電気的注入してから T 電解液を注入することで t-ITP 濃縮を行った後、短チャネルから L 電解液を導入することで ZE 分離に移行するものであり、従来の EKS に比べ溶液交換の手間が省ける点で優れている。

2・3 スウィーピング

硫酸ドデシルナトリウム (SDS) ミセルなどのイオン性擬似固定相と試料成分の移動速度の差を利用した濃縮法はスウィーピングと呼ばれており、電荷をもたない試料の濃縮に利用されている³²⁾。スウィーピングにおいては、分離チャネル内に SDS ミセルを含む泳動液を満たし、ミセルを含まない試料溶液を長いプラグとして注入する。電圧を印加すると、中性成分は EOF によって速く泳動するのに対し、SDS ミセルに可溶化された試料成分の移動速度は減少するため、二液の境界面付近に濃縮される。ミセルに保持されやすい成分ほど、二液間における速度差が大きくなり、効率よく濃縮されるため、スウィーピングは疎水性の高い成分の分析に適しており、CE においては 1000~10000 倍の濃縮率が得られる。

MCE においてもスウィーピングは有効であるが、これまでの適用例は比較的少なく、蛍光色素やエストロゲンの濃縮が報告される程度であった。最近、ウシ血清アルブミン (BSA) を擬似固定相としたスウィーピングと FASS を組み合わせた濃縮法が開発され、緑色蛍光

タンパク質（GFP）の分析に有用であることが示されている³³⁾。FASS による試料注入を行うために低イオン強度の試料マトリックスを用い、擬似固定相として BSA を添加した泳動液を用いることで、GFP の濃縮率は 3600 倍に達しており、大腸菌単一細胞に発現した GFP の検出にも成功している。一方 Sueyoshi らは、ミセル溶液を分離チャンネルに部分的注入してから試料溶液を導入すると、ミセル溶液と試料溶液の境界面付近に試料分子が収束することを見出した³⁴⁾。この濃縮機構はスウィーピングとは異なっており、トラランジェントトラッピング（過渡的捕捉）と名付けられている。蛍光画像解析に基づく理論的計算により、ミセル溶液と試料溶液の境界面付近に収束した SDS ミセルに試料成分が保持され、狭いゾーンに濃縮・捕捉されることが明らかとなっている。ミセルゾーンが拡散により広がるにつれて、濃縮された成分が境界面よりリリースされるため、リリースされる時間の差に基づく分離が可能となり、蛍光色素の濃縮率 280 倍と 10 秒以内の分離を同時に達成している。この手法は MCE 分析のみならず、CE 分析にも適用でき、特に不揮発性のミセルによる検出部の汚染が問題となる質量分析計との結合も可能となるため、疎水的な生体試料分析への応用が期待される。

2・4 ダイナミック pH ジャンクション

ダイナミック pH ジャンクションは、pH の異なる泳動液と試料溶液を利用した試料濃縮法で、弱酸・弱塩基やそれらの両性イオンの濃縮に適しているため、特に生体関連物質の分析に用いられている³⁵⁾。試料成分の等電点もしくは pK_a よりも低い pH の試料マトリックスおよび高い pH の泳動液を用い、試料溶液を長いプラグとして注入すると、成分の荷電状態が二液間で異なり、泳動速度が変化するために境界面付近で濃縮が生じる。CE においては、アドレナリン、ヌクレオチド、プリン、エストロゲン、フラビン、カテコールアミン、アミン酸、ペプチド、タンパク質などの分析に応用されているのに対し、MCE への適用例は最近まで報告されていなかったが、Kazarian らが単糖および二糖類の MCE 分析に本手法を適用し、検出下限を 1 桁下げること成功している³⁶⁾。中性の糖を、カルボキシル基を有するアミノエチルフルオレセインで蛍光誘導体化することにより、ダイナミック pH ジャンクションによる濃縮が可能となっている。

3 試料成分の収束を利用するオンライン試料濃縮法

等電点電気泳動（isoelectric focusing ; IEF）に代表される試料成分が分離カラム内に収束する濃縮技法はイメージング検出が容易な MCE との相性が良く、IEF のみならず様々な収束法が開発されている。収束法におい

ては、直線状チャンネル全体に試料を充填してから濃縮・分離を行うため、電圧制御による試料注入操作が不要となる。試料成分を収束させるためには、陰極および陽極向きの速度成分が釣り合うことが必要になるが、これを実現するために電場、温度、pH の勾配をチャンネル内に形成させ、移動速度がゼロとなる点が試料分子によって異なるような工夫が図られている。

3・1 電場勾配収束法

チャンネル内に形成させた電場勾配および試料成分の泳動と逆向きの圧力流を用いて収束を行う方法は、電場勾配収束（electric field gradient focusing ; EFGF）と呼ばれ、主にタンパク質の濃縮・分離に用いられてきた。この EFGF を行う際には、電場勾配を形成するための先細状のチューブに対し、一定の内径のイオン透過膜チューブを挿入し、膜チューブ内の流速が一定となるように試料溶液を圧力送液する。電圧を印加すると、チューブ径が大きい領域では低電場強度に、小さい領域では高電場強度となるため、電場勾配が生じ、膜チューブ内の試料分子の泳動速度も変化することになる。泳動と逆向きに送液を行うと、ポンプ流速と泳動速度が釣り合う点に試料成分は濃縮される。

MCE に転用する場合は、先細状のチャンネルを形成した基板と直線状チャンネル基板を接合する際にイオン透過膜を間に介することで EFGF を実現できる³⁷⁾。最近では、ヒドロゲルを満たした先細状のチャンネルにワイヤーを通して分離チャンネルを作製することで、モノリス型 EFGF デバイスが開発されている³⁸⁾。また、EFGF の理論計算も進んでおり、分離チャンネル内の電場勾配の形状が線形から非線形になると、ピーク容量が大きく増加することが明らかにされている³⁹⁾。

一方、電場強度勾配をチャンネル内に形成した電極の電位により制御し、圧力流の導入により収束を行う手法は、動的電場勾配収束（dynamic field gradient focusing ; DFGF）と呼ばれる⁴⁰⁾。DFGF はアニオン種の濃縮にしか適用できない欠点があったが、Burke らは両極性の電圧をチャンネル内のアレイ電極に印加できるデバイスを作製し、カチオン種とアニオン種の一斉濃縮分離に成功している⁴¹⁾。また、DFGF においては水の電解に伴う気泡発生が問題となるが、彼らはテフロンシートを用いたガス除去デバイスを開発し、低分子成分の濃縮・分離を実現している⁴²⁾。今後、デバイスのさらなる改良による濃縮時間の短縮およびピーク容量の向上が望まれる。

3・2 双極電極収束法

直線状チャンネル内に金属電極（floating electrode）を作製し、チャンネル両端に電圧を印加すると、電場内におかれた金属は分極して双極電極となる。この双極電極近

傍の特異的な電場勾配を利用して試料成分の収束を行う手法は、双極電極収束（bipolar electrode focusing；BPEF）と呼ばれている^{43)~46)}。CEにおいても、floating electrodeを作製したキャピラリー内で試料成分の濃縮が起きることは知られていたが、水の電解に伴うpH変動に起因する現象ではないかと考えられていた。しかし、Crooksらの研究グループにより、双極電極から陽極向きに電場勾配が形成し、イオン性成分の電気泳動とEOFが釣り合う点に濃縮ピークが現れることが明らかにされた⁴³⁾⁴⁴⁾。BPEFは試料の分離にも適用でき、電荷数の異なるアニオン性蛍光色素が400秒以内に濃縮・分離する様子が示されている⁴⁵⁾。直線状のマイクロチャンネル内の一部に金属薄膜を固定化して電圧を印加するだけで試料の濃縮・分離が実現できるため、簡易分析デバイスとしての発展が期待される。

3・3 温度勾配収束法

キャピラリーや直線状チャンネル内に形成させた温度勾配および試料成分の泳動と逆向きの圧力流を用いて収束を行う方法は、温度勾配収束（temperature gradient focusing；TGF）と呼ばれ、アミノ酸、タンパク質、DNA、ポリマー微粒子など様々な試料を濃縮・分離できることが報告されてきた⁴⁷⁾。分離チャンネルの両端にそれぞれ加熱、冷却ブロックを配することで温度勾配を形成させ、電気泳動速度が温度により変化することを利用して、圧力流の速度と釣り合う点に試料成分を収束させることができる。最近ではキャピラリーベースのTGFを行う例が多く、アミノ酸のキラル分離⁴⁸⁾やアプタマーアッセイ⁴⁹⁾への応用が報告されている。MunsonらはTGFの特徴を活かしたタンパク質に対する結合アッセイを報告している⁵⁰⁾。タンパク質と結合色素の泳動速度が大きく異なることを利用し、遊離した色素のみをキャピラリー内に導入・濃縮することができるため、BSAのようにキャピラリー内面に非特異吸着するタンパク質の存在下でも結合定数を求めることが可能となっている。

マイクロチップへの適用に関しては、これまでに先細型チャンネルにおけるジュール熱勾配を利用したTGFなどが報告されているが、最近ではフリーフロー電気泳動（free-flow electrophoresis；FFE）への適用が試みられている。Beckerらは、長さ12 mm、幅4 mm、深さ17 μm と幅広の分離チャンネルに合計222本のサイドチャンネルを結合したデバイスを作製し、両サイドに加熱および冷却用のペルチェ素子を配することでx軸方向のTGFを行い、濃縮した試料成分をy軸下流側の分取チャンネルに導くことにより、タンパク質のFFEを実現している⁵¹⁾。

3・4 等電点電気泳動（IEF）

IEFのMCEへの適用においては、分離チャンネル全体に両性電解質を含む試料を注入してから、電圧を印加することでpH勾配を形成させ、試料成分を自身の等電点の位置に収束させて濃縮・分離を行う。従来のキャピラリーIEFでは、キャピラリー内に収束した試料成分を検出点に移動させるため、圧力を印加する必要などが生じるが、この移動過程において拡散により試料バンドが広がり、分離能が低下してしまう。これに対し、MCEにおいてはチャンネル全体のイメージング検出（whole-channel imaging detection；WCID）が容易であるため、収束した試料バンドをそのまま検出できる。したがって、移動過程を必要としないために高速かつ高効率なIEF分析を実現できる。これまでにタンパク質の高速IEF分析を目指して、様々なチップデバイスが作製されており、2000年代に入ってから二次元分離MCEデバイス開発の進展に伴い、一次元目の分離モードとしてIEFが注目されてきた。最近ではこれらの検討に加え、FFEデバイスへの応用が試みられており、等電点分離したタンパク質のマイクロ分取が実現しつつある。

WCIDを用いたマイクロチップIEFにおいては、泳動液溜めの液面差により発生する圧力差流が収束位置の再現性を低下させてしまうが、Ouらは液溜めと分離チャンネルの境界に半透膜を作製することで圧力流の影響を低減することに成功している⁵²⁾⁵³⁾。また、MCEでよく用いられる蛍光検出をIEFに適用すると、蛍光ラベルに伴い試料成分の等電点が変わることが問題となるため、紫外吸光WCIDの利用も進展している^{54)~56)}。UV-WCIDにおいては検出感度を向上させるためにチップ上に光スリットを作製する必要があったが、紫外光を吸収するSU-8フォトレジストチャンネルとガラス基板を組み合わせることで、スリット不要なUV-WCID-IEFチップが開発されている⁵⁶⁾。一方、光重合ポリマーゲルを利用したIEFデバイスの開発も進展しており、一次元目のIEFチャンネルから二次元目のゲル電気泳動チャンネルへの試料溶液の混入を防ぐ目的でゲルプラグを位置選択的に作製した二次元分離デバイスや⁵⁷⁾、pH勾配固定化ゲルを分離チャンネル内に作製したIEFチップなどが開発されている⁵⁸⁾⁵⁹⁾。なお、試料注入法の改良も行われており、試料のロスを最小限にするために、試料、陽極液、陰極液を独立して導入できるIEFデバイスが開発されている⁶⁰⁾。

Wenらは、IEFを利用したFFEデバイスの最適化を図っており、三角形の分離チャンネルの下流側に24本の分取チャンネルを結合したデバイス全体をペルチェ素子で2℃まで冷却し、EOFを抑制するためのポリビニルアルコールを試料溶液に添加することで、安定なpH勾配の形成とバンド広がりへの低減を実現し、スラブゲル二次元電気泳動を凌駕する分離能を達成している⁶¹⁾。

Ishibashi らは二段階 IEF による分取デバイスを開発している⁶²⁾。正方形のマイクロチャンバーアレイ (10×10) チップどうしを重ね合わせ、片方の基板を少しずらすことで、縦 10 列または横 10 列の可変型チャンネルアレイとして用いることができる。このデバイスにおいて、横方向の IEF を行った後、基板をずらして縦方向の IEF を行う二段階 IEF に成功しており、最終的にはチャンバーアレイ配置にすることで、分取も可能となっている。このような IEF 分取デバイスはプロテオーム解析に不可欠であり、今後の発展が注目される。

4 固相抽出や動電現象を利用するオンライン試料濃縮法

近年の微細加工技術の進展により、多孔質材料や膜材料を基板上に固定化したマイクロデバイスを作製できるようになり、ナノ構造体をマイクロチャンネル内に作製することも可能となってきた。このようなデバイスを用いた濃縮法と MCE 分離との結合が図られており、多孔質材料に試料成分を吸着させる固相抽出やナノサイズの間隙における電荷排除効果に基づく動電捕捉法を適用した例が報告されている。泳動速度の変化を利用する濃縮法に比べて、濃縮させる試料量を多くできるため、時間は要するものの高い濃縮効率を得ることができる。

4.1 固相抽出

固相抽出場をチップ上に作製し、分離チャンネルと結合した MCE デバイスがいくつか開発されている。以前は ODS 系充填剤微粒子をチャンネル内の一部に充填した例が多かったが、最近ではアフィニティモノリス⁶³⁾、アフィニティゲル⁶⁴⁾、光重合ポリマーゲル⁶⁵⁾、磁気微粒子^{66) 67)}をチャンネル内に固定化したマイクロチップを用いて固相抽出を行う報告が増えている。Mathies らの研究グループでは、アフィニティ捕捉を行うサイトを有するデバイスを O157 の診断に利用することを試みている。病原遺伝子を特異的に捕捉するプローブを結合したポリマーゲルにより PCR リアクターで増幅させた DNA を捕捉・濃縮し、昇温により溶出させた後、MCE 分離した DNA の高感度化検出が実現されている⁶⁵⁾。一方、特定の細胞を捕捉する磁気ビーズをチャンネル内に充填したチップにおいて、O157 大腸菌を捕捉・濃縮した後、PCR で病原遺伝子を増幅し、MCE 分離する試みも報告されており、高バックグラウンド条件でも目的 DNA を検出することに成功している⁶⁶⁾。このように特異的な捕捉・濃縮が可能となる点で固相抽出法は優れており、MCE との組み合わせによる分析時間の短縮化と相まって、診断デバイスやオンサイト分析デバイスとしての発展が望まれる。

4.2 動電捕捉法

近年、ナノサイズの間隙を利用した試料濃縮法として、電気二重層による電荷排除効果に基づく動電捕捉法 (electrokinetic trapping; EKT) あるいは動電濾過法 (electrokinetic filtering) と呼ばれる手法が開発されている⁶⁸⁾。例えば、負に荷電した基板にナノサイズの間隙を作製して電場を印加すると、電気二重層の影響が大きなナノ間隙内ではアニオン種の濃度が局所的に低くなるため、ナノ間隙の入り口付近にイオンが欠乏したゾーンが形成し、このゾーンの手前にアニオン性成分が濃縮される。ナノサイズの間隙を利用した EKT と MCE 分離との結合が図られており、EKT により目的成分を濃縮した後に電圧を切り替えて、濃縮成分を分離チャンネルに導入することで、より高感度に MCE 分析を実現できる。これまでナノサイズの間隙をマイクロチップ上に作製するために、反応性イオンエッチング、酸素プラズマ照射や高強度電場を利用する手法が開発されてきたが、最近ではナフィオン膜⁶⁹⁾、ヒドロゲル⁷⁰⁾、光重合ゲル⁷¹⁾、PET 膜⁷²⁾、酸化チタン膜⁷³⁾の細孔をナノ間隙として利用する手法が報告されている。どの手法においても高効率な濃縮が達成されており、バイオアッセイへの応用もなされている^{69) 74) 75)}。MCE 分離との結合については、市販の電気泳動チップのクロス部直近に光重合法により負に帯電したポリアクリルアミドゲルを固定化し、EKT 濃縮した例が報告されている⁷¹⁾。蛍光イメージングによりアニオン性色素がクロス部中央に濃縮される様子が観測されており、濃縮率は 10 万倍までに達している。蛍光ラベルしたイソマルトオリゴ糖や糖タンパク質の濃縮・分離にも成功していることから、作製したデバイスが糖分析に有効であることが示されている。

5 おわりに

MCE における低感度を改善するため、様々なオンライン試料濃縮法が開発されてきたが、最近では複雑な構造のチップよりもクロス型チャンネルや直線状チャンネルのような単純な構造を有するチップにおける高感度化を目指す方向にシフトしつつあるように思われる。製品化することを考えても、単純な構造のチップにおいて簡便な操作で分離を行い、小型化された検出器で試料成分の検出を行うシステムが望まれており、検出感度を補うための濃縮を簡易な操作で行う技術の進展は不可欠である。また、MCE におけるオンライン試料濃縮法では分離能の低下が問題となっていたが、最近では高感度と高分離能を両立できる手法の開発が進んでおり、質量分析計などとの結合による一層の高性能化が今後望まれる。さらに、FFE チップに代表される収束法に基づく分取デバイスの開発も成熟してきており、nL~μL の試料から目的成分を分取して構造解析を行う分析技術の実用化が期待される。

文 献

- 1) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer : *Sens. Actuators B*, **1**, 244 (1990).
- 2) D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H. M. Widmer : *Anal. Chem.*, **64**, 1926 (1992).
- 3) S. Liu, H. Ren, Q. Gao, D. J. Roach, R. T. Loder, Jr., T. M. Armstrong, Q. Mao, L. Blaga, D. L. Barker, S. B. Jovanovich : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 5369 (2000).
- 4) B. M. Paegel, C. A. Emrich, G. J. Wedemayer, J. R. Scherer, R. A. Mathies : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 574 (2002).
- 5) K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka : *J. Sep. Sci.*, **31**, 2650 (2008).
- 6) D. S. Burgi, R. L. Chien : *Anal. Chem.*, **63**, 2042 (1991).
- 7) S.C. Jacobson, L. B. Koutny, R. Hergenröder, A. W. Moore, Jr., J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 3472 (1994).
- 8) K. S. Lee, M. J. A. Shiddiky, S. H. Park, D. S. Park, Y. B. Shim : *Electrophoresis*, **29**, 1910 (2008).
- 9) S. D. Noblitt, F. M. Schwandner, S. V. Hering, J. L. Collett, C. S. Henry : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1503 (2009).
- 10) Q. Guan, C. S. Henry : *Electrophoresis*, **30**, 3339 (2009).
- 11) K. S. Lee, S. H. Park, S. Y. Won, Y. B. Shim : *Electrophoresis*, **30**, 3219 (2009).
- 12) K. S. Lee, S. H. Park, S. Y. Won, Y. B. Shim : *Electrophoresis*, **31**, 2974 (2010).
- 13) Y. He, H. K. Lee : *Anal. Chem.*, **71**, 995 (1999).
- 14) T. Kawai, K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka : *Anal. Chem.*, **82**, 6504 (2010).
- 15) H. Nagata, M. Ishikawa, Y. Yoshida, Y. Tanaka, K. Hirano : *Electrophoresis*, **29**, 3744 (2008).
- 16) L. Wang D. Liu, H. Chen, X. Zhou : *Electrophoresis*, **29**, 4976 (2008).
- 17) D. Liu, Z. Ou, M. Xu, L. Wang : *J. Chromatogr. A*, **1214**, 165 (2008).
- 18) T. K. Khurana, J. G. Santiago : *Lab Chip*, **9**, 1377 (2009).
- 19) D. Liu, B. Chen, L. Wang, X. Zhou : *Electrophoresis*, **30**, 4300 (2009).
- 20) R. B. Schoch, M. Ronaghi, J. G. Santiago : *Lab Chip*, **9**, 2145 (2009).
- 21) J. Wang, Y. Zhang, M. R. Mohamadi, N. Kaji1, M. Tokeshi1, Y. Baba : *Electrophoresis*, **30**, 3250 (2009).
- 22) H. Nagata, T. Itoh, Y. Baba, M. Ishikawa : *Anal. Sci.*, **26**, 731 (2010).
- 23) C. C. Park, I. Kazakova, T. Kawabata, M. Spaid, R. L. Chien, H. G. Wada, S. Satomura : *Anal. Chem.*, **80**, 808 (2008).
- 24) C. C. Lin, B. K. Hsu, S. H. Chen : *Electrophoresis*, **29**, 1228 (2008).
- 25) L. Y. Qi, X. F. Yin, J. H. Liu : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 4510 (2009).
- 26) T. K. Khurana, J. G. Santiago : *Anal. Chem.*, **80**, 279 (2008).
- 27) R. D. Chambers, J. G. Santiago : *Anal. Chem.*, **81**, 3022 (2009).
- 28) A. Persat, L. A. Marshall, J. G. Santiago : *Anal. Chem.*, **81**, 9507 (2009).
- 29) N. I. Davis, M. Mamunooru, C. A. Vyas, J. G. Shackman : *Anal. Chem.*, **81**, 5452 (2009).
- 30) T. Hirokawa, Y. Takayama, A. Arai, Z. Q. Xu : *Electrophoresis*, **29**, 1829 (2008).
- 31) Z. Q. Xu, K. Murata, A. Arai, T. Hirokawa : *Biomicrofluid.*, **4**, 14108 (2010).
- 32) J. P. Quirino, S. Terabe : *Science*, **282**, 465 (1998).
- 33) Q. Pan, M. Zhao : *Anal. Chem.*, **81**, 5333 (2009).
- 34) K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka : *Anal. Chem.*, **80**, 1255 (2008).
- 35) P. Britz-McKibbin, D. D. Y. Chen : *Anal. Chem.*, **72**, 1242 (2000).
- 36) A. A. Kazarian, E. F. Hilder, M. C. Breadmore : *Analyst*, **135**, 1970 (2010).
- 37) S. L. Lin SL, Y. Y. Li, H. D. Tolley, P. H. Humble, M. H. Lee : *J. Chromatogr. A*, **1125**, 254 (2006).
- 38) X. Sun, P. B. Farnsworth, A. T. Woolley, H. D. Tolley, K. F. Warnick, M. L. Lee : *Anal. Chem.*, **80**, 451 (2008).
- 39) X. Sun, D. Li, A. T. Woolley, P. B. Farnsworth, H. D. Tolley, K. F. Warnick, M. L. Lee : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6532 (2009).
- 40) P. Myers, K. D. Bartle : *J. Chromatogr. A*, **1044**, 253 (2004).
- 41) J. M. Burke, Z. Huang, C. F. Ivory : *Anal. Chem.*, **81**, 8236 (2009).
- 42) J. M. Burke, C. D. Smith, C. F. Ivory : *Electrophoresis*, **31**, 902 (2010).
- 43) R. Dhopeswarkar, D. Hlushkou, M. Nguyen, U. Tallarek, R. M. Crooks : *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10480 (2008).
- 44) D. Hlushkou, R. K. Perdue, R. Dhopeswarkar, R. M. Crooks, U. Tallarek : *Lab Chip*, **9**, 1903 (2009).
- 45) D. R. Laws, D. Hlushkou, R. K. Perdue, U. Tallarek, R. M. Crooks : *Anal. Chem.*, **81**, 8923 (2009).
- 46) R. K. Perdue, D. R. Laws, D. Hlushkou, U. Tallarek, R. M. Crooks : *Anal. Chem.*, **81**, 10149 (2009).
- 47) D. Ross, L. E. Locascio : *Anal. Chem.*, **74**, 2556 (2002).
- 48) G. Danger, D. Ross : *Electrophoresis*, **29**, 3107 (2008).
- 49) M. S. Munson, J. M. Meacham, D. Ross, L. E. Locascio : *Electrophoresis*, **29**, 3456 (2008).
- 50) M. S. Munson, J. M. Meacham, L. E. Locascio, D. Ross : *Anal. Chem.*, **80**, 172 (2008).
- 51) M. Becker, A. Mansouri, C. Beilein, D. Janasek : *Electrophoresis*, **30**, 4206 (2009).
- 52) J. Ou, T. Glawdel, R. Samy, S. Wang, Z. Liu, C. L. Ren, J. Pawliszyn : *Anal. Chem.*, **80**, 7401 (2008).
- 53) J. Ou, C. L. Ren, J. Pawliszyn : *Anal. Chim. Acta*, **662**, 200 (2010).
- 54) M. Vlčková, F. Kalman, M. A. Schwarz : *J. Chromatogr. A*, **1181**, 145 (2008).
- 55) F. Kitagawa, S. Aizawa, K. Otsuka : *Anal. Sci.*, **25**, 979 (2009).
- 56) J. Ou, T. Glawdel, C. L. Ren, J. Pawliszyn : *Lab Chip*, **9**, 1926 (2009).
- 57) J. Liu, S. Yang, C. S. Lee, D. L. DeVoe : *Electrophoresis*, **29**, 2241 (2008).
- 58) G. Sommer, A. K. Singh, A. V. Hatch : *Anal. Chem.*, **80**, 3327 (2008).
- 59) Y. Liang, Y. Cong, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang : *Electrophoresis*, **30**, 4034 (2009).
- 60) K. Shimura, K. Takahashi, Y. Koyama, K. Sato, T. Kitamori : *Anal. Chem.*, **80**, 3818 (2008).
- 61) J. Wen, E. W. Wilker, M. B. Yaffe, K. F. Jensen : *Anal. Chem.*, **82**, 1253 (2010).
- 62) R. Ishibashi, T. Kitamori, K. Shimura : *Lab Chip*, **10**, 2628 (2010).
- 63) W. Yang, X. Sun, T. Pan, A. T. Woolley : *Electrophoresis*,

29, 3429 (2008).

- 64) A. Hokkanen, H. Sirén, L. K. Amundsen, K. Kolari, S. Franssila, S. Tuomikoski, I. Stuns, S. Rovio, T. K. Nevanen, K. Takkinen, H. Söderlund : *Microsyst. Technol.*, **15**, 611 (2009).
- 65) N. Thaitrong, N. M. Toriello, N. Del Bueno, R. A. Mathies : *Anal. Chem.*, **81**, 1371 (2009).
- 66) N. Beyor, L. N. Yi, T. S. Seo, R. A. Mathies : *Anal. Chem.*, **81**, 3523 (2009).
- 67) Y. H. Tennico, V. T. Remcho : *Electrophoresis*, **31**, 2548 (2010).
- 68) J. Dai, T. Ito, L. Sun, R. M. Crooks : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13026 (2003).
- 69) J. H. Lee, Y. A. Song, S. R. Tannenbaum, J. Han : *Anal. Chem.*, **80**, 3198 (2008).
- 70) R. Dhopeswarkar, R. M. Crooks, D. Hlushkou, U. Tallarek : *Anal. Chem.*, **80**, 1039 (2008).
- 71) S. Yamamoto, S. Hirakawa, S. Suzuki : *Anal. Chem.*, **80**, 8224 (2008).
- 72) T. Hahn, C. K. O'Sullivan, K. S. Drese : *Anal. Chem.*, **81**, 2904 (2009).
- 73) K. W. Hoeman, J. J. Lange, G. T. Roman, D. A. Higgins, C. T. Culbertson : *Electrophoresis*, **30**, 3160 (2009).
- 74) T. Kim, E. Meyhofer : *Anal. Chem.*, **80**, 5383 (2008).
- 75) L. F. Cheow, S. H. Ko, S. J. Kim, K. H. Kang, J. Han : *Anal. Chem.*, **82**, 3383 (2010).



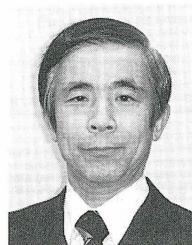
北川文彦 (Fumihiko KITAGAWA)

京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)。
北海道大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》高性能ミクロスケール電気泳動分析システムの開発。《趣味》スポーツ観戦。
E-mail : fkitagawa@anchem.mc.kyoto-u.ac.jp



末吉健志 (Kenji SUEYOSHI)

京都大学大学院工学研究科材料化学専攻。(〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)。
京都大学大学院工学研究科材料化学専攻博士課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》ミクロスケール電気泳動分析の高性能化および高感度化。《趣味》野球観戦、読書。E-mail : sueyoshi@anchem.mc.kyoto-u.ac.jp



大塚浩二 (Koji OTSUKA)

京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)。
京都大学大学院工学研究科工業化学専攻博士課程修了。工学博士。《現在の研究テーマ》マイクロ・ナノスケールの分離分析法の開発と高性能化。《主な著書》“分析化学実技シリーズ 機器分析編 11 電気泳動分析”(分担執筆)(共立出版)。《趣味》音楽鑑賞、ピアノ演奏、パソコン。E-mail : otsuka@anchem.mc.kyoto-u.ac.jp